

論文内容の要旨

申請者氏名 佐藤 有紀

脊椎動物のからだの中軸をなす脊椎は、いくつもの椎骨がからだの前後軸に沿って連なった構造をしている。脊椎骨のみならず、肋骨や骨格筋、血管などの成体におけるほとんどの繰り返し構造は、初期胚においてみられる体節の繰り返しパターンをもとにかたち作られる。体節は、前体節中胚葉 (Presomitic mesoderm、以下「PSM」と略す) と呼ばれるひとつづきの組織が分節化することにより形成される。分節化はからだの基本パターンをつくりだす上で最初に起こる重要な発生現象であるにもかかわらず、その機構は未解明であった。特に、PSM から体節が分離する際に現れる分節境界がどのようにして形成されるのかはほとんど解析されていない。そこで本研究では、予定分節境界 (「レベル-1」と定義) に着目した。

分節境界の形成機構を解明する手がかりを得るため、胚操作が容易であるニワトリ胚を用い、レベル-1 の組織がどのような性質をもつのかを調べた。レベル-1 を取り出し、境界を形成しない領域へ移植したところ、そこに異所的な分節境界が形成された。移植片は、分節境界の両側に存在している場合と、境界の後側のみに存在している場合の 2 通りの局在パターンを示した。前者で形成された分節境界は、移植片内に自律的に形成されたものである。一方後者は、本来は境界を形成しないはずの宿主組織が境界を形成していたことから、移植片により誘導されたものであることがわかった。移植片が異所境界の後側のみに存在していたことから、正常発生過程において、レベル-1 のすぐ後側の部位に分節境界の形成を誘導する活性が存在していることが明らかになった。

Lunatic-fringe (以下、「*L-fng*」と略す) はレベル-1 の後側において発現していることから、分節境界誘導活性と何らかの関わりがあることが期待された。そこで、分節化過程における *L-fng* の役割を知るため、*L-fng* の発現境界をレベル-1.5 につくり出した。その結果、*L-fng* を強制発現させた移植片の前側に、異所的な分節境界が形成された。この結果から、分節境界の誘導過程に *L-fng* が関わることがわかった。*L-fng* は Notch 受容体を糖鎖修飾する糖転移酵素である。*L-fng* が発現している細胞において Notch が活性化している可能性が考えられたため、恒常的活性型 Notch を用いて *L-fng* と同様の操作を行い、検証した。その結果、*L-fng* の場合と同様に Notch 活性化細胞の前側に異所的な分節境界が形成された。すなわち分節境界の誘導は、Notch シグナリングを介して引き起こされることが明らかになった。*Notch1* およびそのリガンドの *Delta1* は PSM 全体で発現しており、その発現パターンからは Notch シグナリングが活性化している部位を知ることはできなかった。以上の結果は、Notch シグナリングがレベル-1 の後側部位に限局して活性化していることを示唆している。

正常な分節化過程において、境界誘導能はレベル-1 の後側のみに現れる。レベル-1

の後側に位置している細胞は、どのようにしてこの誘導能を獲得するのだろうか？この疑問に答える手がかりを得るため、本来は境界を形成しない領域の組織をレベル-1の環境下へ移し、影響を調べた。その結果、移植片は宿主胚と同じ位置で分節境界を形成した。移植片の腹側には、完全に除去することができなかった宿主胚の体節組織が残っていた。宿主胚の体節組織を完全に除去できた場合には、移植片に分節境界は形成されなかった。これらの結果から、レベル-1の腹側部位には、その背側に分節境界を誘導する何らかの活性が存在している可能性が示唆された。

レベル-1の腹側部位がその背側に分節誘導することを直接的に検証するため、レベル-1の腹側部位のみを取り出し、境界を形成しない領域へ移植した。その結果、異所的な分節境界が背側に誘導された。すなわち、腹側から背側に向かって分節誘導が起こることが証明された。しかし、レベル-1の背側部位を移植片として用いた場合にも同様の分節誘導活性を示したことから、腹側部位のみが特別な誘導能を有しているわけではないことが判明した。異所境界は必ず移植片の背側だけに形成され、腹側には形成されないという特徴を示した。つまりこの誘導シグナルは、腹側から背側へ一方向に伝わるという性質を持つ。

以上の研究から、分節境界は誘導現象により形成されること、この誘導シグナルには前後軸に沿って伝わるものと、背腹軸に沿って伝わるものの2種類あることが明らかになった。境界誘導能をもつ細胞は、レベル-1の後側部位に局在している。この部位から発せられる境界誘導活性を「セグメンター (segmenter)」と名付けた。セグメンターの活性はNotchシグナリングを介する。本研究ではこれらの知見をもとに、PSMの3次元構造内において分節境界がどのようにして構築されていくのかを考察した。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 佐藤 有紀

脊椎動物の個体発生におけるパターン形成の研究は、分子レベルから細胞・組織、そして器官や個体レベルまでを視野に入れた総合学問であり、体の成り立ちの理解という基礎学問からバイオメディカル関連の応用技術まで幅広く貢献する重要な分野である。

本論文においては、ニワトリ初期胚の体節分節に注目し、その現象的組織的特徴を生かしてパターン形成の基本原理に迫ろうとしている。体節分節の幾何学的特徴を利用し、まずドナー胚の次分節部位より細胞を取り出し、それらをホスト胚の非分節領域に移植すると、そこで異所的な形態分節が誘導されることを見出している。これは正常体節の分節過程において、境界形成が細胞間に交わされる誘導作用により引き起こされるということを示す証拠となった。本研究においては、この新規の誘導活性をセグメンターと名付けている。加えて、分子生物学的解析と生きたままの胚顕微操作とを巧みに組み合わせて、セグメンターが **Notch** シグナルにより調節されていることを見出されている。脊椎動物の分節現象には **Notch** シグナルが大きく関わることは以前にも示唆されていたが、本研究によりその作用機序が明瞭に示された。セグメンターの前後軸における作用機構に加えて、本論文ではさらに背腹軸に沿った制御機構についても新しいことを見出されている。次分節部位における腹側の一部の細胞集団が存在すれば、形態境界を引き起こすのに十分であると述べられている。

本論文は、示されている発見のほとんどが全く新規のものであり、学術上の貢献度は高い。また体節形成のみならず、体の形作りにおける境界形成の分子機構を探る上で重要な基本原理を提供する。加えて本研究のほとんどは、研究指導者や周囲の研究者との密接なディスカッションを基本として佐藤有紀自身が行ったものであり、本人の研究能力は高く評価される。よって、審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値のあるものと認めた。